

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Hedviga Planinčić**

6503/PT

**UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA U RIZOMU DVODOMNE**  
**KOPRIVE (*Urtica dioica* L.)**  
**ZAVRŠNI RAD**

Modul: Kemija i tehnologija voća i povrća

Mentor: *prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac*

Zagreb, 2016.

## **DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**

**Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća**

### **UDIO BIOAKTIVNIH SPOJEVA U RIZOMU DVODOMNE KOPRIVE**

*(Urtica dioica L.)*

**Hedviga Planinčić, 6503/PT**

**Sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj gnojidbe tla dušikom na udio bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi) u rizomu dvodomne koprive. Kao kontrolni uzorak korišten je rizom uzgojen na tlu koje nije tretirano gnojivom, a drugi rizom na tlu koje je tretirano gnojivom u količini 100 kg N/ha. Ekstrakcija ukupnih fenola provedena je primjenom destilirane vode i 50 %-tne vodene otopine etanola (v/v) uz primjenu ultrazvučne kupelji. Fenolni spojevi (ukupni fenoli, flavan-3-oli i hidroksicimetne kiseline) su određeni spektrofotometrijski. Utvrđene su veće koncentracije svih skupina fenolnih spojeva u rizomima koji su tretirani gnojivom u odnosu na netretirane.

**Ključne riječi:** fenolni spojevi, rizomi koprive, gnojidba dušikom

**Rad sadrži:** 25 stranica, 8 slika, 1 tablicu, 24 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof. dr.sc. Verica Dragović-Uzelac*

**Pomoć pri izradi:** *dr.sc. Maja Repajić, viši asistent*

**Rad predan:** srpanj, 2016.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Undergraduate studies Food Technology**

**Department of Food Engineering**

**Laboratory of Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing**

### **CONTENT OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN ROOT OF STINGING NETTLE**

**(*Urtica dioica* L.)**

**Hedviga Planinčić, 6503/PT**

**Abstract:** The aim of this study was to determine the influence of nitrogen fertilization on the content of bioactive compounds (phenolic compounds) in stinging nettle root. The controlled sample used was the cultivated stinging nettle root, which was not treated with nitrogen fertilization. The other sample of stinging nettle root was treated with a solution of 100 kg N/ha nitrogen fertilization. The extractions of total phenols was performed in ultrasound bath using distilled water and 50% aqueous ethanol (v/v) as extraction solvent. Phenolic compounds (total phenols, flavan-3-ols and hydroxycinnamic acid) were detected by spectrophotometric method. The higher amounts of bioactive compounds are determined in the stinging nettle root with 100 kg N/ha fertilization.

**Keywords:** phenolic compounds, nettle root, nitrogen fertilization

**Thesis contains:** 25 pages, 8 figures, 1 table, 24 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Maja Repajić, Scientific Assistant*

**Thesis delivered:** July, 2016.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. KOPRIVA ( <i>Urtica dioica</i> , L.) .....	2
2.1.1. Kemijski sastav koprive .....	2
2.1.2. Utjecaj gnojidbe na koprivu .....	3
2.2. FENOLNI SPOJEVI .....	3
2.2.1. Fenolne kiseline.....	4
2.2.2. Flavonoidi.....	5
2.2.3. Fenolni spojevi koprive .....	7
2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA .....	8
2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija .....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	9
3.1. MATERIJALI .....	9
3.1.1. Osušeni rizomi koprive ( <i>Urtica dioica</i> L.) .....	9
3.1.2. Kemikalije i standardi.....	9
3.1.3. Aparatura i pribor .....	12
3.2. METODE .....	13
3.2.1. Ekstrakcija .....	13
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	13
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina .....	15
3.2.4. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	19
4.1. Utjecaj gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju ukupnih fenola.....	19
4.2. Utjecaj gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina .....	20
4.3. Utjecaj gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju polimernih proantocijanidina (flavan-3-ola) ....	21
5. ZAKLJUČAK .....	22
6. LITERATURA .....	23

## 1. UVOD

Dvodomna kopriva (*Urtica dioica*, L.) rasprostranjena je diljem svijeta. Samonikla je, višegodišnja biljka koja najčešće raste na tlima bogatima fosfatima i organskim tvarima. Dijelovi biljke koji se najviše koriste su listovi i korijen koprive, a od njih se pripremaju sokovi, čajevi i tinkture (Kraljić Strgačić, 2013). Poznata je kao namirnica bogata mineralima, vitaminom C i provitaminom A. Mladi listovi koprive sadrže 20 puta više C vitamina od zelene salate. Osim vitamina sadrži brojne bioaktivne komponente poput biljnih sterola, fenolnih spojeva, karotenoida, klorofila itd. Zbog visokog udjela bioaktivnih spojeva pripisuju joj se pozitivni učinci na metaboličke i fiziološke procese u organizmu pa se zbog toga koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, medicini i kulinarstvu.

U narodnoj medicini se koristila kao diuretik, za liječenje artritisa i reume. Brojna znanstvena istraživanja potvrdila su pozitivna djelovanja preparata na bazi koprive, a to su antidijabetičko, diuretičko i laksativno djelovanje, liječenje bolesti slezene, astme i upale plućne maramice. Zbog širokog spektra bioaktivnih spojeva kopriva se također koristi u ublažavanju tegoba poput dijabetesa, probavnih i respiratornih poremećaja, alergije, bolesti prostate, anemija, visoki krvni tlak i razne upale (Taylor, 2005). Vodeni ekstrakti koprive pokazali su hipoglikemijsku aktivnost, a etanolni ekstrakti antifungalnu aktivnost. Kopriva je i dalje predmet istraživanja zbog protuupalnog djelovanja te djelovanja na bolest benigne hiperplazije prostate (Orčić i sur., 2014).

Jednu od skupina bioaktivnih spojeva koprive čine fenolni spojevi čiji maseni udio u rizomu ili nadzemnom dijelu ovisi o primijenjenim agrotehničkim mjerama među koje spada i način gnojidbe. Fenolni spojevi se iz biljnog materijala ekstrahiraju najčešće primjenom vode ili vodenih otopina etanola uz primjenu klasičnih ili novih metoda.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti da li gnojidba tla dušikom ima utjecaj na udio bioaktivnih spojeva u rizomu dvodomne koprive. Koristila su se dva uzorka rizoma koprive. Kao kontrolni uzorak korišten je rizom uzgojen na tlu koje nije tretirano gnojivom, a drugi rizom na tlu koje je tretirano gnojivom u količini 100 kg N/ha. U istraživanju su se koristila dva različita otapala za ekstrakciju, voda i 50 %-tna vodena otopina etanola, kako bi se odredio utjecaj na količinu ekstrahiranih bioaktivnih spojeva rizoma. Određivani su slijedeći fenolni spojevi: ukupni fenoli, flavan-3-oli i hidroksicimetne kiseline.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOPRIVA (*Urtica dioica*, L.)

Kopriva (*Urtica dioica*, L.) je višegodišnja samonikla biljka iz porodice Urticaceae (Orčić i sur., 2014). Ime roda dolazi od latinske riječi *urere* što znači peći. Na listovima i stabljici nalaze se posebne vrste biljnih dlaka (trihoma) koje pri dodiru izazivaju peckanje na koži zbog kemijskih tvari koje ispuštaju. Ime vrste *dioica* znači dvodomno zato što biljke obično sadrže ili muške ili ženske cvjetove (Taylor, 2005). Zeljasta je trajnica s kratkim, puzavim, razgranjenim podankom i dlakavom stabljikom. Ima razgranat korijenov sustav s puno dugih rizoma (Stepanović i sur., 2009). Listovi su jajasti, osnovica srolika, a vrh ušiljen.

#### 2.1.1. Kemijski sastav koprive

U kemijskom sastavu koprive nalaze se: aglutinin, acetofenon, alkaloidi, acetilkolin, klorogenska kiselina, buterinska kiselina, klorofil, kafeinska kiselina, karbonatna kiselina, kolin, histamin, kumarinska kiselina, mravlja kiselina, pantotenska kiselina, kemferol, koproporfin, lektin, lecitin, lignan, linolna i linolenska kiselina, palmitinska kiselina, ksantofil, serotonin, stigmasterol, terpen, violaksantin i jantarna kiselina. Kopriva također sadrži 2,5 % masti, 14-17 % albumina i 18 % proteina u suhoj tvari. U jednom kilogramu svježih koprive nalazi se 130 mg vitamina C, 730 mg karotena i oksalata. Biljne dlake (trihoma) sadrže mravlju kiselinu, histamin i acetilkolin. Te komponente izazivaju žarenje na koži prilikom dodira listova ili stabljike koprive. Listovi koprive sadrže provitamin A, vitamin B1, K, ksantofil i sistosterin. Pepeo sadrži 6,3 % željezo (III) oksida, kalija, kalcija i silicija. Koristeći GC metodu (plinska kromatografija), u rizomu su pronađene ove masne kiseline: linolna kiselina, palmitinska kiselina, palmitoleinska kiselina, stearinska kiselina, gadoleinska kiselina i eruka kiselina (Otles i Yalcin, 2012). Istraživanjem Belščak-Cvitanović i sur. (2011) izmjerena vrijednost kafeinske kiseline u vodenom ekstraktu koprive iznosi  $1,386 \pm 0,048$  mg/g.

### **2.1.2. Utjecaj gnojidbe na koprivu**

Gnojidba utječe na prinos, kvalitetu i kemijski sustav biljne vrste koja se gnoji. Gnojidba mora biti umjerena kako ne bi negativno utjecala na količinu aktivnih tvari. U istraživanju Radman (2015) utvrđeno je da pretjerana gnojidba dušikom utječe na smanjenje količine suhe tvari, količine željeza, cinka, mangana i bakra u suhoj tvari koprive. Pri gnojidbi sa 100 kg N/ha vrijednosti ukupnih fenola bile su u rasponu od 357,42 mg GAE/100 g (1. rok košnje) do 862,96 mg GAE/100 g u svježem uzorku (2. rok košnje). Raspon ukupnih fenola tijekom vegetacije koprive na lokaciji Blatuša kretao se od 357,42 mg GAE/100 g (100 kg N/ha), do 945,80 mg GAE/100 g u svježem uzorku (0 kg N/ha), a obje su vrijednosti utvrđene u 1. roku košnje. Utvrđeno je da je u svim rokovima košnje gnojidba dušikom imala negativan utjecaj na sadržaj ukupnih fenola u biljnom materijalu te su najviše vrijednosti ukupnih fenola utvrđene na kontrolnim varijantama (0 kg N/ha). Kod gnojidbe 0 kg N/ha sadržaj ukupnih fenola varirao je od 572,65 do 962,70 mg GAE/100 g svježe tvari, dok je pri aplikaciji 100 kg N/ha vrijednost ukupnih fenola bila niža, od 417,59 do 811,52 mg GAE/100 g svježe tvari. U cilju postizanja visoke zdravstvene i nutritivne vrijednosti herbe, preporučuje se koprivu uzgajati iz presadnica uz primjenu gnojidbe od 100 kg N/ha.

Grevsen i sur. (2008) istraživali su utjecaj gnojidbe dušikom na koncentraciju flavonoida i fenolnih kiselina u ekstraktima lišća i stabljike koprive u 80 %-tnoj vodenoj otopini metanola. Dokazano je da se većom koncentracijom dušika u gnojivu smanjuje koncentracija flavonol glikozida i fenolnih kiselina u koprivi.

## **2.2. FENOLNI SPOJEVI**

Fenolni spojevi, odnosno polifenoli se mogu definirati kao bioaktivne tvari koje pozitivno utječu na zdravlje ljudi (Otles i Yalcin, 2012). Sekundarni su metaboliti biljaka, imaju ulogu u zaštiti od UV zračenja i napada patogena. Posjeduju aromatski prsten na kojeg je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (slika 1). Polifenoli se mogu podijeliti na: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Manach i sur., 2004).

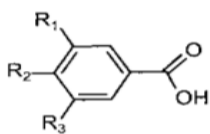
Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline. Najveće i najviše istražene skupine flavonoida su: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli (katehini) i njihovi polimeri proantocijanidini te antocijanidini. Stilbeni su polifenoli koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida, a sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu (Rastija i Medić-Šarić, 2009). Znanstvena istraživanja su pokazala da polifenoli imaju dobar utjecaj na koronarne srčane bolesti, visok krvni tlak, dijabetes, kancerogena stanja, virusna i parazitska oboljenja (Otles i Yalcin, 2012). Polifenoli su iz nutritivnog aspekta najpoznatiji zbog svojih iznimnih antioksidacijskih svojstava, zahvaljujući kojima pomažu u prevenciji mnogih patoloških poremećaja u organizmu, kao što su ateroskleroza, disfunkcija moždanih tkiva i kancerogena stanja (Gordon, 1996). Polifenoli reagiraju kao antioksidansi zbog sposobnosti prelaska u fenoksil-radikale, tako što otpuste vodikov ion koji se veže na slobodni radikal i stabilizira ga.

### **2.2.1. Fenolne kiseline**

Fenolne kiseline se prema strukturi mogu podijeliti na derivate benzojeve kiseline i derivate cimetne kiseline. U voću i povrću razina hidroksibenzojeve kiseline je relativno niska, osim u nekim vrstama crvenog voća, crne rotkvice, luka i u pokožici krumpira gdje su razine prilično visoke. Hidroksicimetne kiseline su u voću i povrću češće prisutne nego hidroksibenzojeve kiseline (Lafay i Gil-Izquierdo, 2008). Najvažniji predstavnici hidroksicimetnih kiselina: ferulinska kiselina, kafeinska kiselina, sinapinska kiselina i *p*-kumarinska kiselina (slika 1). Te kiseline se rijetko nalaze kao slobodne kiseline, osim u procesiranoj hrani koja je prošla procese zamrzavanja, sterilizacije ili fermentacije (Manach i sur., 2004). Zbog svog antioksidacijskog djelovanja fenolne kiseline imaju pozitivno djelovanje na zdravlje ljudi (Lafay i Gil-Izquierdo, 2008).

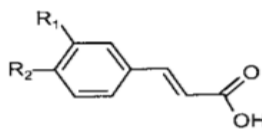


### Hidroksibenzojeve kiseline



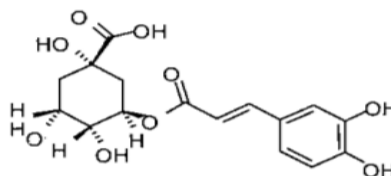
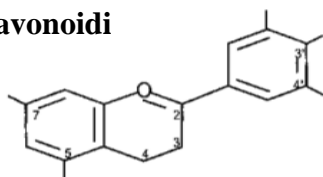
$R_1=R_2=OH$ ,  $R_3=H$ : protokatehinska kiselina  
 $R_1=R_2=R_3=OH$ : galna kiselina

### Hidroksicimetne kiseline



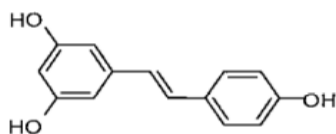
$R_1=OH$ : kumarinska kiselina  
 $R_1=R_2=OH$ : kafeinska kiselina  
 $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=OH$ : ferulinska kiselina

### Flavonoidi



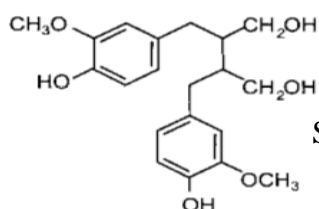
Klorogenska kiselina

### Stilbeni



Resveratrol

### Lignani

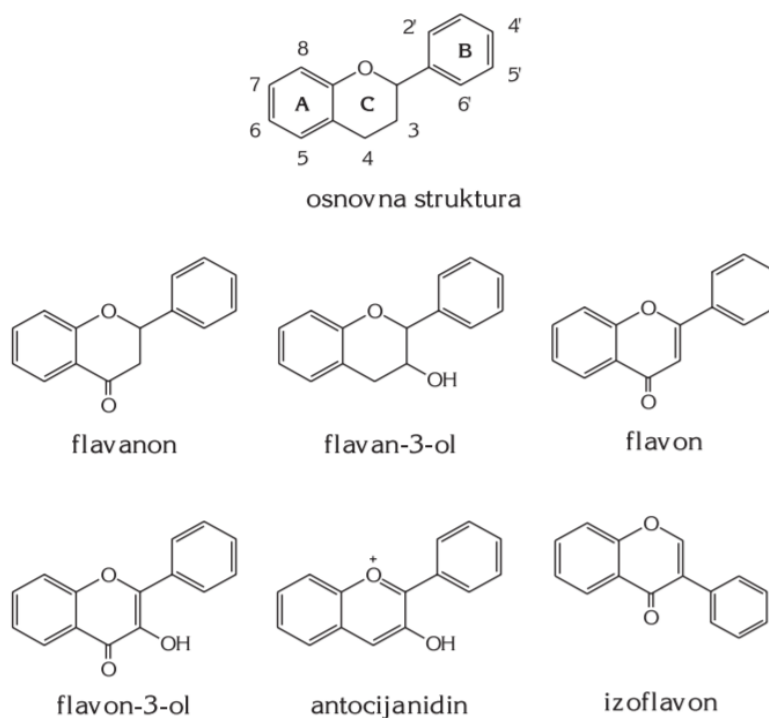


Sekoizolaricirezinol

**Slika 1.** Kemijske strukture polifenola (Manach i sur., 2004)

#### 2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani su u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida. Oni imaju važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkcija biljaka, a došavši u njih putem hrane, imaju sličnu ulogu i za druga živa bića. Osim sposobnosti sparivanja elektrona slobodnih radikala, flavonoidi imaju sposobnost vezanja iona prijelaznih metala ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004). Svi flavonoidi imaju isti strukturni skelet  $C_6-C_3-C_6$  koji se sastoji od dva aromatska  $C_6$  prstena (A i B) i heterocikličkog prstena (C) koji sadrži jedan atom kisika (slika 2). Podijeljeni su u šest podskupina: flavanoni, flavoni, flavan-3-oli, flavonoli, antocijanidini, izoflavoni (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011).



**Slika 2.** Osnovna struktura i skupine flavonoida (Kazazić, 2004)

Proantocijanidini ili kondenzirani tanini su polimeri flavan-3-ola koji je široko rasprostranjen u biljnom kraljevstvu i među najčešćim polifenolima u prehrani ljudi. Flavan-3-oli imaju sposobnost stabiliziranja slobodnih radikala i stvaranja kompleksa sa metalnim ionima i drugim makromolekulama kao što su proteini i polisaharidi. Mnoga istraživanja su pokazala da flavan-3-oli imaju antioksidativnu, antikancerogenu, antimikrobnu i neuro-zaštitnu aktivnost. Biotransformacije i bioraspoloživost limitiraju utjecaj flavan-3-ola na zdravlje te je to obično određeno stupnjem polimerizacije. Monomeri flavan-3-ola se odmah apsorbiraju u tankom crijevu, dok oligomerni i polimerni oblici prolaze netaknuti kroz gastrointestinalni trakt, dolaze u debelo crijevo gdje ih crijevna mikrobiota transformira prije nego što se apsorbiraju (Monagas i sur., 2011).

### 2.2.3. Fenolni spojevi koprive

Otles i Yalcin (2012) navode da je istraživanjem u rizomu koprive pronađeno 18 različitih fenolnih komponenti i 8 različitih lignana.

Rizom sadrži skopoletin, sterole, masne kiseline, polisaharide i izolecitine. Neki lecitini koprive pokazali su antivirusna svojstva protiv HIV-a i virusa gornjih dišnih puteva. Flavonoidi listova koprive i lecitin iz rizoma su u prvoj fazi istraživanja dokumentirani kao imunološki stimulansi što je dovelo do pretpostavke da bi lecitin mogao biti koristan u liječenju bolesti sistemski lupus. Neka istraživanja su pokazala da ekstrakt rizoma koprive snižava krvni tlak bolje nego kontrolni lijek (furosemid) i poboljšava lučenje urina. U više od 20 kliničkih studija rizom koprive (i kopriva kombinirana s drugim biljem) utvrđeno je pozitivno djelovanje na bolest benigne hiperplazije prostate (BPH) (Taylor, 2005).

Orčić i sur. (2014) su utvrdili da je udio polifenola u korijenu koprive značajno niži nego u ostalim dijelovima biljke. Detektirane su veće količine samo ovih komponenti: sekoizolaricirezinol (nađen samo u korijenu), *p*-kumarinska kiselina, kininska kiselina i skopoletin (tablica 1).

**Tablica 1.** Rezultati udjela fenola u ekstraktima koprive (*Urtica dioica*) (izraženi u mg/g suhog ekstrakta) (Orčić, 2014)

Spoj	Urtica dioica 1					Urtica dioica 2					Urtica dioica 3				
	cvijeće	biljka	korijen	listovi	stabljika	cvijeće	biljka	korijen	listovi	stabljika	cvijeće	biljka	korijen	listovi	stabljika
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	0,064	0,021	0,032	0,037	0,021	0,017	0,0106	0,029	0,021	0,023	0,036	0,03	0,048	0,0151	0,014
gentizinska kiselina	0,0096	0,0105	n.d.	0,0034	n.d.	0,0044	0,009	0,0036	0,0082	det	n.d.	0,0076	n.d.	det	n.d.
protokatehinska kiselina	0,07	0,038	n.d.	0,048	n.d.	0,032	0,054	0,015	0,16	0,014	0,022	0,058	0,0106	0,072	0,0069
vanilinska kiselina	det	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	det	n.d.	n.d.	n.d.	0,09	n.d.	n.d.
kininska kiselina	1,6	0,24	0,1	0,3	0,047	0,27	0,15	0,31	0,36	0,039	0,86	0,65	0,36	0,66	0,088
<i>p</i> -kumarinska kiselina	n.d.	0,09	0,12	n.d.	0,24	0,0105	0,13	0,2	n.d.	0,38	0,022	0,1	0,23	0,026	0,18
kafeinska kiselina	0,48	0,36	det	0,21	0,0053	0,41	0,32	0,0118	0,29	0,033	0,64	0,63	0,0039	0,93	0,031
ferulinska kiselina	0,071	0,016	0,011	0,009	0,031	0,09	0,034	0,028	0,013	0,061	0,05	0,056	0,024	0,052	0,024
5- <i>O</i> -kafeoli kininska kiselina	36	3,8	0,056	1,23	0,29	15,8	5,7	0,029	2,7	1,87	35	17,4	0,025	28	2,3
eskuletin	0,041	0,0145	det	0,012	0,015	0,0078	0,01	0,0047	0,0125	0,019	0,0095	0,0096	det	0,0074	det
skopoletin	0,103	0,038	0,076	0,012	0,026	0,018	0,039	0,11	0,021	0,054	0,04	0,091	0,18	0,073	0,048
sekoizolaricirezinol	n.d.	n.d.	det	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,009	n.d.	n.d.
krizeriol	det	det	det	det	det	det	det	det	det	det	0,0027	det	det	det	det
kamferol	det	det	n.d.	n.d.	n.d.	0,007	n.d.	n.d.	n.d.	det	0,019	det	n.d.	n.d.	n.d.
isoramnetin	det	det	n.d.	n.d.	n.d.	0,036	det	n.d.	n.d.	det	0,047	det	n.d.	n.d.	n.d.
katehin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,076	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
kamferol 3- <i>O</i> -glukozid	0,074	0,0059	n.d.	n.d.	n.d.	0,7	0,031	n.d.	n.d.	0,0068	0,6	0,123	n.d.	0,07	0,017
kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	0,63	n.d.	n.d.	n.d.	0,0316	3,64	0,04	0,0054	0,0024	0,38	2,82	1,12	n.d.	1,08	0,48
kvercitrin	0,0124	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
rutin	6,1	0,98	0,0023	0,00182	0,4	4,6	1,43	0,0186	0,0206	1,35	9,5	7,3	0,0054	4,6	2,25
amentoflavin	det	0,0059	det	det	det	det	det	det	det	det	det	det	det	det	det
n.d.- ne detektirani															
det- detektirani ali ispod limita kvantifikacije															

## **2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA**

### **2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija**

Ultrazvuk se nekad koristio samo za čišćenje i emulgiranje dok se danas primjenjuje na mnogim područjima kao što su ekstrakcija, sušenje, kristalizacija, filtracija, zamrzavanje, homogenizacija, sterilizacija, degradacija itd. (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Ultrazvuk niske snage upotrebljava visoke frekvencije, više od 100 kHz i intenzitet manji od  $1 \text{ W/cm}^2$ . Prilikom primjene ne uzrokuje fizičke niti kemijske promjene u svojstvima medija pa se smatra neinvazivnom tehnikom i prikladan je za ispitivanje struktura i značajki prehrambenih sustava tijekom obrade (on-line). Ultrazvuk visoke snage upotrebljava niže frekvencije, između 18 i 100 kHz i intenzitet viši od  $1 \text{ W/cm}^2$  (Režek Jambrak i sur., 2010).

Ultrazvučna ekstrakcija jednostavan je postupak koji uključuje uporabu zvučnih valova kako bi se ekstrahirao uzorak uronjen u organskom otapalu. Ultrazvuk visoke energije izaziva kavitacije, koje mogu uzrokovati fizičke promjene materijala te određene kemijske reakcije na materijalima na kojima je primijenjen (Kaselj, 2012). Kavitacije uzrokuju bubrenje stanica i probijanje staničnih stijenki zbog čega je omogućeno veće prodiranje otapala u materijal i jednostavnije ispiranje sastojaka stanice. Ultrazvukom se poboljšava bioraspoloživost mikronutrijenata i zadržavaju se njihova izvorna svojstva te se povećava efikasnost ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Moguće je izbjeći nastajanje slobodnih radikala kako bi se izbjeglo uništavanje bioaktivnih sastojaka. Slobodni radikali se mogu i iskoristiti kako bi se postigla hidroksilacija polifenola i karotenoida te se tako povećala njihova biološka aktivnost (Ashokkumar i sur., 2008).

U istraživanju Kamran Khan i sur. (2010) provedena je standardna ekstrakcija fenola iz narančine kore te je pri istim uvjetima provedena i ultrazvučna ekstrakcija. Ultrazvučnom ekstrakcijom u vremenu od 15 minuta je ekstrahirana veća količina ukupnih fenola nego standardnom ekstrakcijom u 60 minuta. Ultrazvučna ekstrakcija je uzrokovala mehanička oštećenja na staničnim stjenkama te je omogućena bolja ekstrakcija u kraćem vremenskom razdoblju čime se smanjuje utrošak energije. Količine ekstrahiranih flavanona su također više kod ultrazvučne ekstrakcije nego kod standardne. Nije dokazana degradacija flavona tijekom ultrazvučne ekstrakcije jer do razgradnje dolazi pri višim frekvencijama od korištenih u ovom istraživanju (20 kHz). Prinos ekstrakcije je također viši kod ultrazvučne ekstrakcije. Ovim

istraživanjem je dokazana efikasnost ultrazvučne ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim metodama.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Osušeni rizomi koprive (*Urtica dioica* L.)**

Za istraživanje su korišteni rizomi koprive uzgojeni različitom gnojidbom dušikom. Uzorak rizoma koprive (**R1**) uzgojen je iz presadnica, tretiran gnojidbom 100 kg N/ha. Uzorak rizoma koprive (**R2**) uzgojen je iz presadnica bez gnojidbe, 0 kg N/ha. Presadnice su se sadile u proljeće 2013. godine, a rizomi su izvađeni u jesen 2014. godine i osušeni na zraku. Rizome je prije analize bilo potrebno usitniti kako bi se mogla provesti ekstrakcija. Usitnjeni su u tarioniku s tučkom, a zatim u mlinu do forme praha. Oba uzorka (R1 i R2) su pripremljena na isti način.

##### **3.1.2. Kemikalije i standardi**

###### **Kemikalije za postupak ekstrakcije**

Otapala za ekstrakciju:

- Destilirana voda
- 50 %-tna vodena otopina etanola

## **Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola**

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens) (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Anhidrid natrijevog karbonata (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- Standard galne kiseline (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

Priprema: Odvaje se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

## **Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina**

- Koncentrirana 37 %-tna klorovodična kiselina (Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija)
- 96 %-tni etanol (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina masene koncentracije 1 g/L HCl (u 96 %-tnom etanolu)

Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96 %) do oznake.

- Klorovodična kiselina masene koncentracije 2 g/L HCl

Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard kafeinske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kafeinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvaje se 10 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 5 mL 80 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80 %-tnim metanolom.

- Standard klorogenske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvaje se 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

### **Kemikalije i standardi za određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom**

- 100 %-tni metanol (J.T. Baker, Nizozemska)
- Vanilin (Acros organics, Geel, Belgija)
- 1 %-tna metanolna otopina vanilina

Priprema: 1 g vanilina se u odmjernoj tikvici od 100 ml nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake.

- Koncentrirana 96 %-tna  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija)
- 25 %-tna otopina  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Priprema: 13,02 mL 96 %-tne  $\text{H}_2\text{SO}_4$  prenese se u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je prethodno dodano malo 100 %-tnog metanola (cca 20 mL). Tikvica se obavezno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  se dodaje u malim obrocima. Po dodatku cijelog volumena kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.

- Standard katehina (5 g/L) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)

Priprema: Odvaje se 500 mg standarda katehina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Centrifuga (ROTOFIX 32, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Njemačka)
- Spektrofotometar (UV-1600PC, VWR, Radnor, Pennsylvania, SAD )
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Digital ultrasonic cleaner UC-50 A, BIOBASE, Shandong, Kina)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA- Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Njemačka)
- Rotavapor (B-490, BÜCHI, Flawil, Švicarska)

Pribor:

- Staklene kivete
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL i 1L
- Menzura, volumena 100 mL i 1L
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje
- Laboratorijska čaša, volumena 100 mL i 250 mL
- Erlenmeyerova tikvica
- Plastične kivete
- Mikropipete, volumena 100  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L
- Lijevak
- Stalak za epruvete
- Tarionik s tučkom
- Büchnerov lijevak



## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Ekstrakcija**

Prije ekstrakcije rizome (R1 i R2) je bilo potrebno usitniti. Prvo su usitnjeni u tarioniku s tučkom, a zatim u mlincu do forme praha. Odvagano je 15 g praha rizoma u laboratorijsku čašu, kvantitativno prebačeno u Erlenmeyerovu tikvicu te dodano 450 ml otapala za ekstrakciju (destilirane vode). Uzorci su ekstrahirani u ultrazvučnoj kupelji 30 minuta na 70-72 °C. Nakon ekstrakcije sadržaj tikvice prenesen je u odmjernu tikvicu od 500 mL te nadopunjen otapalom do oznake. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani 10 minuta na 5500 o/min te nakon toga filtrirani. Za ekstrakciju s drugim otapalom (50 %-tnom vodenom otopinom etanola) odvagano je 1 g uzorka te dodano 40 mL otapala. Ekstrakcija je provedena na isti način kao s destiliranom vodom.

### **3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola**

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom i vodenom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

#### *Postupak određivanja*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 µL ekstrakta, 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (destilirana voda i 50 %-tna otopina etanola). Određivanje se provodi u paraleli.

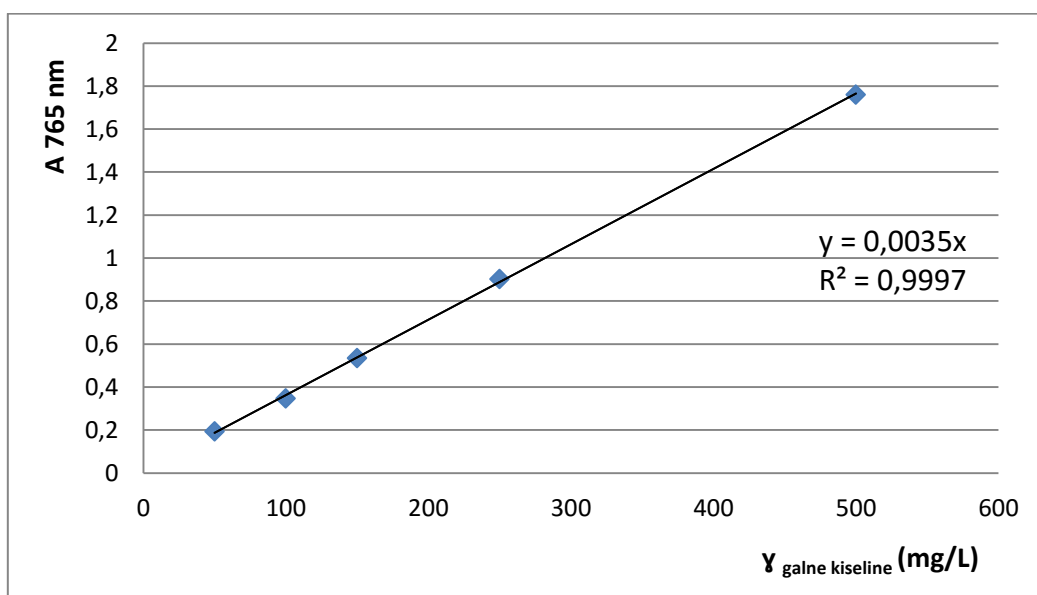
## Izračunavanje

### Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100  $\mu$ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200  $\mu$ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri  $T=50^{\circ}\text{C}$  (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100  $\mu$ L destilirane vode.. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 3).



**Slika 3.** Ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0035x$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 765 nm

x-koncentracija galne kiseline (mg/L)

R<sup>2</sup>- faktor determinacije

### **3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina**

Određivanje se provodi u etanolnom i vodenom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm (Howard i sur., 2003).

#### *Postupak određivanja*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta, 250 µL 1g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (destilirana voda i 50 %-tna vodena otopina etanola). Određivanje se provodi u paraleli.

#### *Izračunavanje*

##### **Izrada baždarnog pravca**

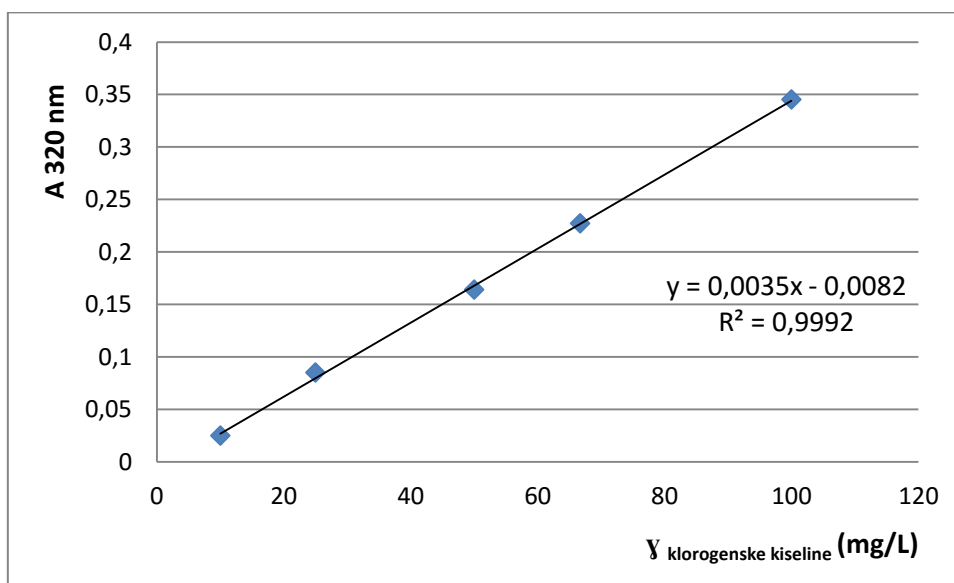
Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za klorogensku kiselinu.

### Klorogenska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66.7 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1, 2.5, 5 i 6.67 mL i nadopuni 80 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250  $\mu$ L otopine standarda, 250  $\mu$ L 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije klorogenske kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 320 nm. Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 4).



**Slika 4.** Ovisnost apsorbancije o koncentraciji klorogenske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0035x - 0,0082$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 320 nm

x-koncentracija klorogenske kiseline (mg/L)

R<sup>2</sup>- faktor determinacije

### **3.2.4. Određivanje polimernih proantocijanidina vanilin metodom**

Princip određivanja polimernih proantocijanidina temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun i sur., 1998).

#### *Postupak određivanja*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 mL ekstrakta. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (destilirana voda i 50 %-tna vodena otopina etanola). Određivanje se provodi u paraleli.

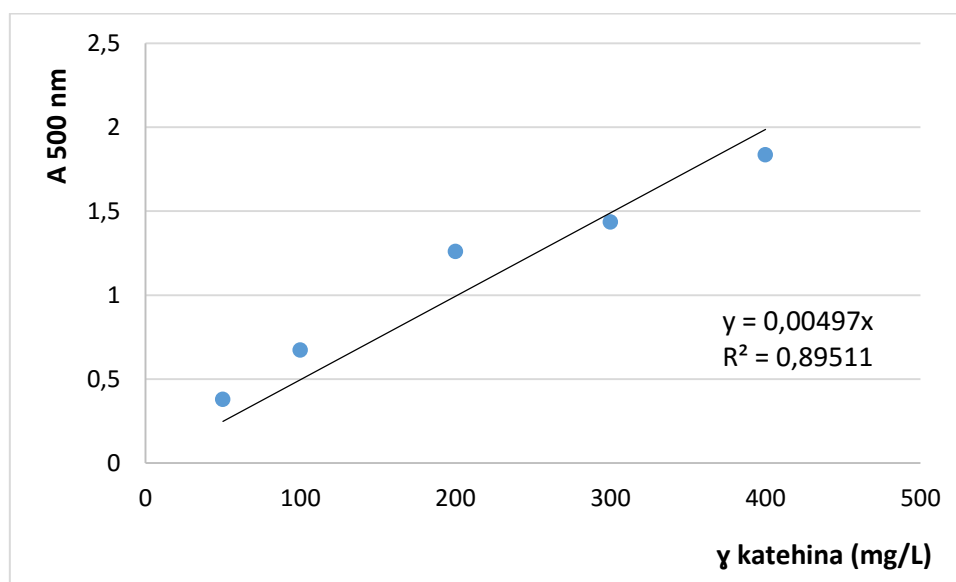
#### *Izračunavanje*

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina koncentracije 5 g/L (500 mg/100 mL). Od te otopine prirede se slijedeća razrjeđenja: 50, 100, 200, 300 i 400 mg/100 mL na način da se otpipetira redom: 1, 2, 4, 6 i 8 mL alikvotne otopine u odmjerne tikvice od 10 mL, te se do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima za metanol.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije katehina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 500 nm. Koncentracija flavan-3-ola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 5).



**Slika 5.** Ovisnost apsorbancije o koncentraciji katehina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,00497x$$

gdje je:

y- apsorbancija uzorka pri 500 nm

x-koncentracija katehina (mg/L)

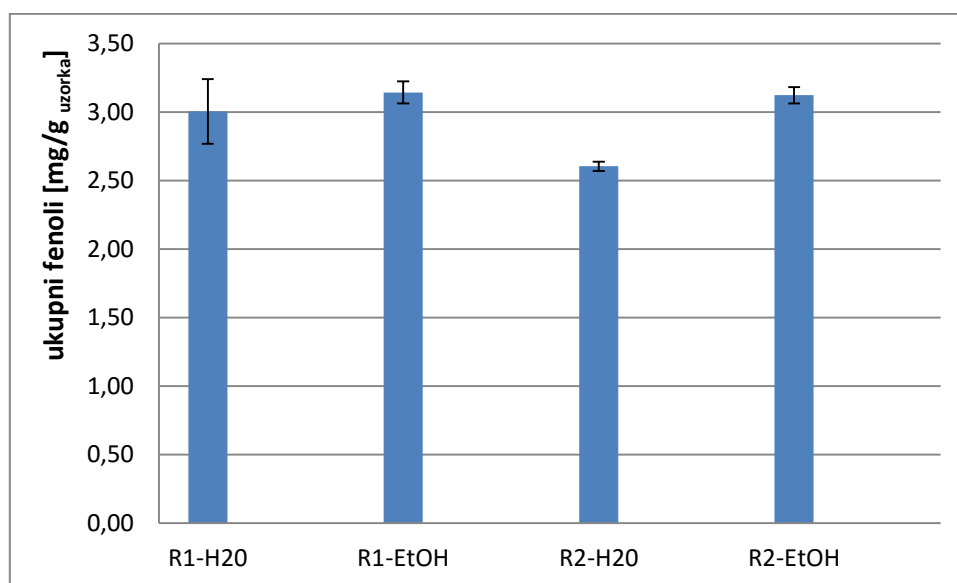
$R^2$ - faktor determinacije

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je ultrazvučna ekstrakcija fenolnih spojeva iz rizoma koprive s dva različita otapala, destiliranom vodom i 50 %-tnom vodenom otopinom etanola. Jedan rizom je uzgojen na tlu koje nije tretirano gnojivom (R2), a drugi rizom na tlu koje je tretirano gnojivom u količini 100 kg N/ha (R1). Količina ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i proantocijanidina određena je spektrofotometrijski.

##### 4.1. Utjecaj gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju ukupnih fenola

Rezultati utjecaja gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju ukupnih fenola prikazani su grafički na slici 6, a izraženi su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.

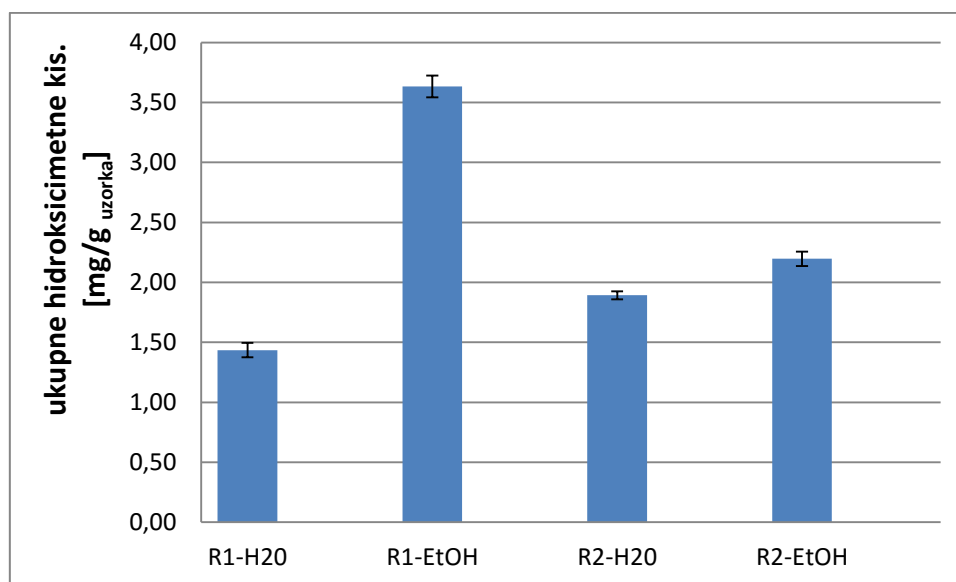


**Slika 6.** Utjecaj gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju ukupnih fenola u rizomima koprive

Rezultati pokazuju da su voda i etanol dobra otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva iz rizoma koprive, ali su nešto bolji prinosi ukupnih fenola dobiveni uz upotrebu 50 %-tne vodene otopine etanola. Istraživanja Dent i sur. (2013) također potvrđuju da je za izolaciju fenola iz listova kadulje smjesa etanola i vode bila najpogodnije otapalo. Usporedimo li masene udjele ukupnih fenola u rizomima uočava se da su u etanolnim ekstraktima koncentracije podjednake neovisno o gnojidbi. U uzorku R2 koncentracija ukupnih fenola je 3,12 mg/g, a u uzorku R1 iznosi 3,14 mg/g. U vodenim ekstraktima određene su veće razlike u masenim udjelima ukupnih fenola među rizomima. U uzorku R2 iznosi 2,60 mg/g, a u uzorku R1 iznosi 3 mg/g. Budući da su razlike u koncentraciji ukupnih fenola među R1 i R2 male može se zaključiti da gnojidba nema značajan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola u rizomima koprive.

#### 4.2. Utjecaj gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina

Rezultati utjecaja gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina prikazani su grafički na slici 7, a izraženi su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.



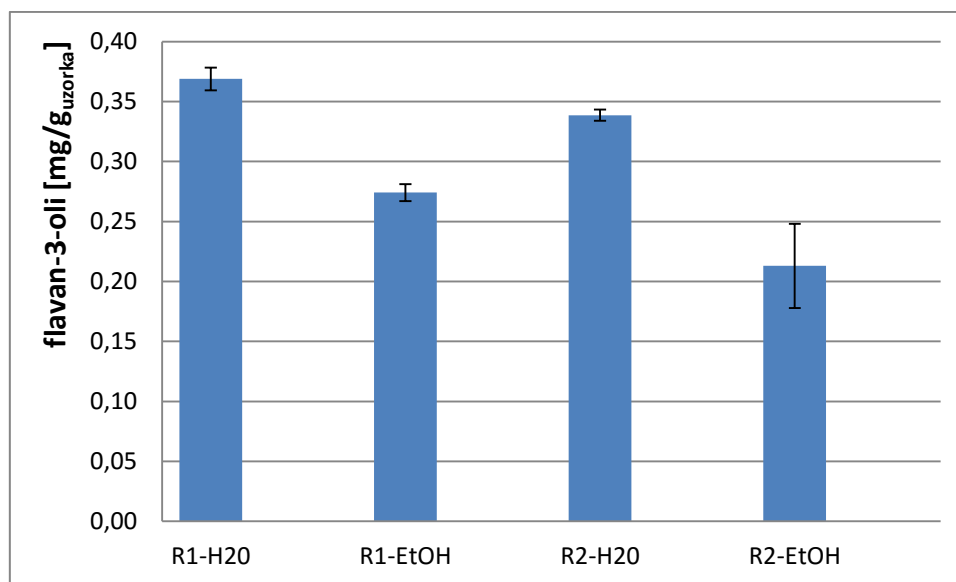
**Slika 7.** Utjecaj gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina u rizomima koprive



Više koncentracije hidroksicimetnih kiselina određene su u etanolnim ekstraktima, što ukazuje da je 50 %-tna vodena otopina etanola bolje otapalo za izolaciju hidroksicimetnih kiselina od vode. U etanolnim ekstraktima su više vrijednosti hidroksicimetnih kiselina detektirane u uzorku R1 (3,63 mg/g) nego u R2 (2,20 mg/g). Iz čega se može zaključiti da je zbog gnojidbe došlo do povećanja hidroksicimetnih kiselina u rizomima koprive. U vodenim ekstraktima je obrnuto, više vrijednosti hidroksicimetnih kiselina detektirane su u uzorku R2 (1,89 mg/g) nego u R1 (1,44 mg/g). Ovi rezultati pokazuju da je gnojidba utjecala na smanjuje količina hidroksicimetnih kiselina u rizomima koprive.

#### 4.3. Utjecaj gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju polimernih proantocijanidina (flavan-3-ola)

Rezultati utjecaja gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju flavan-3-ola prikazani su grafički na slici 8, a izraženi su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.



**Slika 8.** Utjecaj gnojidbe i vrste otapala na ekstrakciju polimernih proantocijanidina (flavan-3-ola) u rizomima koprive

Za ekstrakciju flavan-3-ola kao bolje otapalo pokazala se destilirana voda gdje je u oba rizoma određen viši udio flavan-3-ola u odnosu na etanolne ekstrakte. Vodeni i etanolni ekstrakti pokazuju viši udio flavan-3-ola u ekstraktu R1 (0,37 mg/g, 0,27 mg/g) nego u ekstraktu R2 (0,34 mg/g, 0,21 mg/g). Iz navedenog se može zaključiti da gnojidba utječe na povećanje koncentracije flavan-3-ola u rizomima koprive.

## **5. ZAKLJUČAK**

Na temelju provedenih analiza, rezultata i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Gnojidba nije imala značajan utjecaj na maseni udio ukupnih fenola u rizomima koprive. U netretiranim rizomima koprive i rizomima koprive tretiranim gnojivom u količini 100 kg N/ha određeni su podjednaki udjeli.
2. Maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina i flavan-3-ola više su u uzorcima rizoma koji su tretirani gnojivom u količini 100 kg N/ha nego u rizomima koji nisu tretirani gnojivom. Stoga se može zaključiti da gnojidba 100 kg N/ha ima pozitivan učinak na udio ovih skupina fenolnih spojeva u rizomima koprive.
3. Za ekstrakciju ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina iz rizoma koprive 50 %-tna vodena otopina etanola se pokazala kao bolje otapalo nego destilirana voda. Za ekstrakciju polimernih proanticijanidina kao bolje otapalo pokazala se destilirana voda.

## 6. LITERATURA

Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., Versteeg, C. (2008) Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **9**, 155-160.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanković, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**, 1094-1101.

Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol. Biotech.* **51**, 84-91.

Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.

Ghasemzadeh, A. i Ghasemzadeh, N. (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res.* **5**, 6697-6703.

Gordon, M.H. (1996) Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat. Prod. Rep.* 265-273.

Grevsen, K., Fretté, X. C. i Christensen, L. P. (2008) Concentration and Composition of Flavonol Glycosides and Phenolic Acids in Aerial Parts of Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) are Affected by Nitrogen Fertilization and by Harvest Time. *Eur. J. Hortic. Sci.* **73**, 20–27.

Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C. (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 1238-1247.

Kaselj, I. (2012) Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenata ultrazvukom. Hrvatska znanstvena bibliografija < [https://bib.irb.hr/datoteka/621009.Zavrzni\\_rad\\_IK-DA-2012.pdf](https://bib.irb.hr/datoteka/621009.Zavrzni_rad_IK-DA-2012.pdf) > [06.06.2016.]

Kazazić, P.S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **55**, 279-290.

Kamran Khan, M., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., Chemat, F. (2010) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem.* **119**, 851-858.

Kraljić Strgačić (2013)

<<https://lightofayurveda.wordpress.com/2013/03/05/kopriva-cisti-krv-lijeci-i-obnavljaj-cijelo-tijelo/>> [04.06.2016.]

Lafay, S. i Gil-Izquierdo, A. (2008) Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem. Rev.* **7**, 301–311.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 727-747.

Monagas, M., Llorach, R., Garrido, I., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Patan, F., Gomez-Cordoves, C., Andres-Lacueva, C., Bartolome, B. (2011) Dietary flavan-3-ols: health effects, bioavailability and nutritional biomarkers of exposure. *Nova Science Publishers*, 335-352.

Orčić, D., Francisković, M., Bekvalac K., Svirčev, E., Beara I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. (2014) Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem.* **143**, 48-53.

Otles, S., Yalcin, B. (2012) Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *Scientific World J.*, 1-12.

Radman, S. (2015) Utjecaj gnojidbe dušikom i načina uzgoja na kemijski sastav dvodomne koprive (*Urtica dioica*, L.)

Rastija, V. i Medić-Šarić, M. (2009) Kromatografske analize polifenola. *Kem. Ind.* **58** (3) 121–128.

Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Werner, Z. (2010): Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kem. Ind.* **59** (4), 169-177.

Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.

Stepanović B., Radanović D., Turšić I., Nemčević N., Ivanec J. (2009) Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja. Jan Spider, Pitomača.

Sun, B.S., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I. (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4267-4274.

Taylor, L. (2005) *The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals*, New York.